

NOVEL MICROORGANISM BELONGING TO BIFIDOBACTERIUMLONGUM, PREPARATION OF ITS MICROBIAL CELL, AND COMPOSITIONCONTAINING SAID MICROORGANISM

Patent Number: JP58224685

Publication date: 1983-12-27

Inventor(s): KAWASHIMA TAKUJI; others: 04

Applicant(s): MORINAGA NIYUGIYOU KK

Requested Patent: JP58224685

Application Number: JP19820106182 19820622

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N1/20; A23K1/00; A23L1/00; A61K35/74

EC Classification:

Equivalents: JP1605020C; JP59053829B

Abstract

PURPOSE:To obtain novel microbial cell resistant to acid and useful as a food, feed and medicine for intestinal disorder, by the anaerobic cultivation of human feces.

CONSTITUTION:Human feces, especially feces of a suckling baby are diluted with physiological saline water, and cultured anaerobically in MG agar plate medium at 37 deg.C. The colony having the characteristic shape of Bifidobacterium, the Gram-positive character, and rod, clavate or branched cell form is fished from the obtained colonies, and subjected to the anaerobic culture in an MG agar plate medium in the same manner as above to obtain a separated pure bacterial strain. The strain is cultured anaerobically in an MG agar plate medium adjusted to 4.5-5.5pH, and the obtained colony is subjected to the anearobic culture in an MG agar plate medium containing 0.5-1.0 unit of penicillin G potassium per 1ml. The objective Bifidobacterium longum M-8201 (FERM- P No.6548) having strong acid resistance can be separated from the well-grown strains.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭58—224685

⑤Int. Cl. ³	識別記号	府内整理番号	⑬公開 昭和58年(1983)12月27日
C 12 N 1/20		7115—4B	
A 23 K 1/00	101	7803—2B	発明の数 4
A 23 L 1/00		7258—4B	審査請求 未請求
A 61 K 35/74	ACR	7138—4C	
// A 23 C 9/12		7236—4B	
(C 12 N 1/20			
C 12 R 1/01)			

(全 19 頁)

④ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含む組成物

①特 願 昭57—106182

②出 願 昭57(1982)6月22日

③發明者 川島拓司

川崎市高津区土橋3—18—5

④發明者 工藤力

横浜市緑区若草台4—74

⑤發明者 平松明徳
八王子市鹿島8—4—301
 ⑥發明者 寺口進
多摩市落合3—4—3—501
 ⑦發明者 八重島智子
東京都目黒区南2—6—7
 ⑧出願人 森永乳業株式会社
東京都港区芝5丁目33番1号
 ⑨代理人 弁理士 津田昭

明細書

1. 発明の名称

ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含有する組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5°Cで7日間保持した時、少くとも1%の生存率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガム。

(2) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムが下記の菌学的性質を示すことを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の菌株。

(a) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5°Cで7日間保持した時、少

くとも1%の生残率を有する耐酸性。

(b) B.L寒天平板培地を用い、37°Cで48

時間嫌気培養したときの菌の形態：

① 大きさ：0.5~0.8×1.7~4.0μ

② 形状：桿状あるいは分枝状

(c) B.L寒天平板培地を用い、37°Cで48

時間嫌気培養したときのコロニーの形態：

① 形状：円形

② 隆起：凸円状

③ 周縁：円滑

④ 大きさ(直径)：1~3mm

⑤ 色調：褐色で不透明

⑥ 表面：円滑で光沢あり

(d) ガス：産生せず

(e) 15°Cで発芽せず

特開昭58-224685(2)

(f) 運動性なし

(g) 好気的条件で発育せず

(h) ブドウ糖からの主発酵生成物：乳酸および酢酸

(i) 糖からの酸生成：

アラビノース、キシロース、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シュークロース、マルトース、ラクトース、メリビオースおよびメレチトースは陽性、

ラムノース、リボース、セロビオース、トレハロース、グリコーゲン、イヌリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、エスクリン、サリシン、アミグダリンおよびグルコン酸塩は陰性、

ラフィノースおよびデキストリンは遅れて陽性、

マンノース、スターチおよび α -メチルグルコシ

ドは遅れて弱陽性、

(j) インドール：產生せず、

(k) 硫化水素：產生せず、

(l) 硝酸塩を還元せず、

(m) カタラーゼ：陰性、

(n) ベニシリンを含むMG寒天平板培地（ベニシリンGカリウム：0.5～1.0単位/ mL ）で発育する。

(3) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムが
ビフィドバクテリウム・ロンガムM-8201
〔微研菌寄第6548号〕
であることを特徴とする特許請求の範囲第1項
または第2項に記載の新菌株。

(4) 人の糞便を生理食塩水で希釈し、嫌気性菌
培養用寒天平板培地で、37°Cにおいて嫌気的
に培養すること、得られたコロニーの中からビ

フィドバクテリウム属特有の形態を示し、グラム陽性であって、桿状、こん棒状または分枝状の菌形を示すコロニーを飼菌すること、得られた菌を上記嫌気性菌培養用寒天平板培地で、37°Cにおいてさらに嫌気的に培養すること、および得られた菌をpH 4.5～5.5であって、上記嫌気性菌培養用寒天平板培地で培養し、さらに0.5～1.0単位/ mL のベニシリンGカリウムを含む上記の嫌気性菌培養用寒天平板培地で培養し、生育の良い菌株中より下記の菌学的性質を有する菌株を分離採取することを特徴とする菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して、5°Cで7日間保持した時、少くとも1%の生残率を有する耐酸性、

(5) 前記の菌学的性質が下記のものであることを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載の方

(a) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5°Cで7日間保持した時、少くとも1%の生残率を有する耐酸性、

(b) BL寒天平板培地を用い、37°Cで48時間嫌気培養したときの菌の形態：

① 大きさ：0.5～0.8×1.7～4.0 μ

② 形状：桿状あるいは分枝状

(c) BL寒天平板培地を用い、37°Cで48時間嫌気培養したときのコロニーの形態：

① 形状：円形

② 隆起：凸円状

③ 周縁：円滑

特開昭58-224685(3)

ス、グリコーゲン、イヌリン、マンニトール、ソルビ

トール、イノシトール、エスクリン、サリシン、アミ

グダリンおよびグルコン酸塩は陰性、

ラフィノースおよびデキストリンは遅れて陽性、

マンノース、スターチおよびα-メチルグルコシ

ドは遅れて弱陽性、

(j) インドール：産生せず、

(k) 硫化水素：産生せず、

(l) 硝酸塩を還元せず、

(m) カタラーゼ：陰性、

(n) ベニシリソウを含むMG寒天平板培地(ベ

ニシリソウカリウム：0.5～1.0単位/mL)

で発育する。

(o) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを

4.3に調整して、5°Cで7日間保持した時、少

(微研菌寄第6548号)
であることを特徴とする特許請求の範囲第8項
に記載)
の組成物。

(i) 前記の組成物が食品としての用途を有することを特徴とする特許請求の範囲第8項または第9項に記載の組成物。

(ii) 前記の組成物が飼料としての用途を有することを特徴とする特許請求の範囲第8項または第9項に記載の組成物。

(iii) 前記の組成物が整腸剤としての用途を有することを特徴とする特許請求の範囲第8項または第9項に記載の組成物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は耐酸性を有するビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifido-bacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ロンガムM-8201

(4) 大きさ(直径)：1～3mm

(5) 色調：褐色で不透明

(6) 表面：円滑で光沢あり

(d) ガス：産生せず

(e) 15°Cで発育せず

(f) 運動性なし

(g) 好気的条件で発育せず

(h) ブドウ糖からの主発酵生成物：乳酸および酢酸

(i) 糖からの酸生成：

アラビノース、キシロース、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シュークロース、マルトース、ラクトース、メリピオースおよびメレチトースは陽性、

ラムノース、リボース、セロピオース、トレハロ

くとも1%の生残率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガムを生育培地に培養して、菌体を増殖させることを特徴とする前記ビフィドバクテリウム・ロンガムの製造方法。

(7) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムが

ビフィドバクテリウム・ロンガムM-8201

(微研菌寄第6548号)
であることを特徴とする特許請求の範囲第6項に記載の方法。

(8) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを

4.3に調整して、5°Cで7日間保持した時、少

くとも1%の生残率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガムの生菌菌体を含有することを特徴とする組成物。

(9) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムが

ビフィドバクテリウム・ロンガムM-8201

(*Bifido-bacterium longum* M-8201)
(以下「本菌」と記載する)、その製造方法およびこれらを含む組成物に関する。

本発明の目的は耐酸性を有する点に有用性の高い新規微生物を提供すること、この新規微生物を分離採取することおよびこの新規微生物を増殖することからなる新規微生物の菌体の製造方法を提供することにある。

本発明のもう1つの目的は耐酸性を有する新規微生物を含有する食品用、飼料用ならびに整腸剤組成物を提供することにある。

本明細書における「生残率」は試験開始時の生菌数に対する保存後の生菌数の百分率であり、また「嫌気性菌培養用寒天平板培地」はB.I. 寒天平板培地、M.G. 寒天平板培地、その他嫌気性菌を培

berorum)、*B. ラクテンチス* (*B. lacte-*
nis)、*B. アドレツセンチス a* (*B. adol-*
escentis a) ~d、*B. ロンガム a* (*B.*
longum a)とbの8菌種に分類し (*Zentral-*
blatt für Bakteriologie, paras-
itenkunde & Infektions Krankhei-
ten und Hygiene : Abt. I, Origin-
ale、191卷第486頁、1963年)、光岡は人および動物に由来するすべての菌を*B.*
ビフィダムについて2つのタイプ、*B. インファ-*
ンチスについて2つのタイプ、*B. ブレーべ*につ-
いて3つのタイプ、*B. パルブローラム*について
2つのタイプ、*B. サーモフィルム* (*B. the-*
rmo philum) について4つのタイプ、*B. ア-*
ドレツセンチスについて4つのタイプ、*B. ロン*

特開昭58-224685(4)
養するために一般に広く使用されている寒天平板培地である。

ビフィドバクテリウム属に属する微生物は、人または動物（たとえば、豚、ニワトリ、モルモット、ネズミ、マウスなど）の消化管、糞便中に見出され、これらのものから多数の菌種あるいは菌株が分離されている。

ビフィドバクテリウム属に属する菌の分類については、1963年に Reuter が人に由来する菌をビフィドバクテリウム（以下「*B.*」と略記する）・ビフィダム a (*Bifido-bacterium bifidum a*) と b、*B. インファンチス* (*B. infantis*)、*B. パルブローラム a* (*B. pa-*
rvulorum a) と b、*B. ブレーべ a* (*B. b-*
reve a) と b、*B. リベローラム* (*B. li-*

ガムについて4つのタイプ、*B. シュードロンガム* (*B. pseudo-longum*) について4つのタ-
イプ、*B. リベローラム* および *B. ラクテンチス* についてそれぞれ1つのタイプに分類して報告してい-
ている。

そして国際微生物学会の中におかれている細菌の命名と分類についての国際委員会のビフィドバクテリウム小委員会は *B. ビフィダム*、*B. インファンチス*、*B. ブレーべ*、*B. サーモフィルム*、*B. アドレツセンチス*、*B. ロンガム*、*B. シュードロンガム*、*B. スイス* (*B. suis*)、*B. コリネフォルム* (*B. coryneforme*)、*B. アステロイデス* (*B. asteroides*) および *B. インディカム* (*B. indicum*) の11菌種に分類し、*Bergey's Manual* 第8版にもとりあげ

られている (Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 第669頁～第676頁、Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1974年)。

そしてビフィドバクテリウムに属するその他の
菌類については、Scardovi (Archiv für
Mikrobiologie 第68巻、第278頁
1963年およびZentralblatt für Bakteriologie, parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene
Abt. II, Originale、第123巻、第64頁 1969年)により、B. ルミナーレ (B. ruminalis) および B. グロボスム (B. glo-

ksonii) がそれぞれ報告されている。

更に American Type Culture Collection (以下「ATCC」と略記する) のカタログ (Catalogue of Strains I, 13th ed.、第45頁—第47頁、1978年) によれば、前記の種の他に B. ベルミフォルメ (B. *vermiforme*) が知られている。このように、ビフィドバクテリウム属に属する菌種は多数知られているが、ビフィドバクテリウム属の菌種の分類の日本における権威者であり、前記国際委員会の委員である光岡の著書 (本間道、光岡知足共編「ビフィズス菌」第35頁～第36頁、鶴ヤクルト本社、1978年7月) によれば、現状では、なお主として糖分解性状によって次のように鑑別分類するのが妥当であるとされている。

特開昭58-224685 (5)
bosum) が、 Crociani (International
Journal of Systematic Bacteriology、 第24巻、 第6頁、 1974年) により、
B. デンチウム (*B. dentium*)、 B. カテヌ
ラーツム (*B. catenulatum*) および B. ア
ングラータム (*B. angulatum*) が、 Zani
(International Journal of Systematic
Bacteriology、 第24巻、 第29頁
1974年) により、 B. マグナム (*B. mag-
num*) が、 Trovatelli (Archiv für
Mikrobiologie、 第98巻、 第187頁、
1974年) により、 B. プローラム (*B. pro-
lorum*) が、 Georg (Journal of Bacte-
riology、 第88巻、 第477頁、
1964年) により、 B. エリクム (*B. eri-*

それによればこの属の種は、B. ピフィダム *a*、
B. ピフィダム *b*、B. インファンチス サブス
ピーシーズ（以下「*s.s.*」と略記する）インファンチス (*B. infantis subspecies infantis*)、B. インファンチス *s.s.* リベローラ
ム、B. インファンチス *s.s.* ラクテンチス、B.
ブレーべ *s.s.* ブレーべ、B. ブレーべ *s.s.* バルブ
ローラム、B. サーモファイルム (B. ルミナーレ
と同一表現型)、B. アルドレツセンチス *a*、B.
アルドレツセンチス *b* (B. デンチウムおよびB.
エリクソニと同一表現型)、B. アルドレツセン
チス *c* (B. カテヌラーツムと同一表現型)、B.
アルドレツセンチス *d* (B. アングラーツムと同
一表現型)、B. ロンガム *s.s.* ロンガム *a*、B.
ロンガム *s.s.* ロンガム *b*、B. ロンガム *s.s.* アニ

マリス a (*B. animalis a*) (*B.* マグナム、
B. スイスおよび*B.* プローラムと同一表現型)、
B. ロンガム *ss.* アニマリス b 、*B.* シュードロ
 ンガム (*B.* グロボスマと同一表現型)、*B.* ア
 ステロイデス (*B.* コリネフォルメと同一表現型)
 および*B.* インディカムである。さらに光岡の最
 近の著書（光岡知足著「腸内菌の世界」叢文社、
 1980年8月）によれば*B.* ロンガム *ss.* アニ
 マリス a および b は、*B.* ロンガムの亜種 (*s-*
ubspecies) ではなく、新たに*B.* アニマリス
 として分類されている。

B. ロンガムに属する公知細菌の菌株の菌学的性
 質について前記光岡およびBergey's Manual
 第8版に記載されている事項をまとめれば、第1
 表のとおりである。

文 献	(1)			(2)			(3)		
	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム a	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム a	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム b	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム b	<i>B.</i> ロンガム ロイター
種および バイオタイプ	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ガラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
シユークロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
セロビオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
トレハロース	-	-	-	-	-	-	-	-	-
メリビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
メレチース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
デキストリン	±	±	±	±	±	±	±	±	±
スターチ	±	±	±	±	±	±	±	±	±

(後に續く)

種および バイオタイプ	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム a	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム a	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム b	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム b	<i>B.</i> ロンガム ロイター
グリコゲン	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イヌリン	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マンニトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ソルビトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
リビトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ズルシトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グリセロール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エリスリトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エスクリン	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(後に續く)

種および バイオタイプ	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム a	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>ss.</i> ロンガム b	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム <i>var.</i> ロンガム	<i>B.</i> ロンガム ロイター
ガラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
シユークロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
セロビオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラクトース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
トレハロース	-	-	-	-	-	-	-	-	-
メリビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
メレチース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
デキストリン	±	±	±	±	±	±	±	±	±
スターチ	±	±	±	±	±	±	±	±	±

文 献

(1) 日本細菌学雑誌、第24巻 第6号 第261
頁～第280頁、1969年。

(2) 本間道、光岡知足共編「ビフィズス菌」第
52頁 株式会社ヤカルト本社、1978年7月。

(3) Buchanan, R. E. & Gibbons, N.E編、
*Bergey's Manual of Determinative
Bacteriology* 第8版、第672頁～第
673頁、Baltimore, The Williams &
Wilkins Co.、1974年。

記号の説明

十一：強陽性

一：陰性

S：おくれて反応

十一：陰性またはおくれて弱陽性

∨ ; 不 定

一：まれに陽性

三 1

(a) 精胞は長く、弯曲した棍棒状あるいは隆起又は啞鈴状の桿状であり、二またに分かれることがある。

(b) グラム染色性は変動する。

(c) コロニーは凸状ないしクツシヨン状あるいは全縁、直徑2~5mm、軟かく潤滑し、光沢または粘性あり。

(d) グルコースからの最終生産物：酢酸および L-(+)-乳酸、ガス酸性せず。

(c) ベントースを発酵し、グルコン酸塩を発酵しないビフィドバクテリアは、通常この群に分類され、以前デーネルト (1957年および1980年)⁶ の第5群に分類されていた。

(f) 4.6.5°C および 20°C において生育せず。

(a) 乳児期上齶成人の糞便から分離される

(b) 標準菌株: E 194 b; ATCC 15303

(Reuters, 1971年)

一方ビフィドバクテリウム属に属する菌は、人又は動物の腸内菌叢を形成する主要な菌であることが知られており、従来これらの菌は整腸剤、食品、栄養剤あるいは飼料に広く利用されている。

しかしながら、ビフィドバクテリウム属に属する公知の菌は一般に耐酸性に乏しく、酸性の状態におけるこの菌の生残率は極めて低い（日本細菌学雑誌、29巻4号、691～697頁、1974年及び薬剤学、28巻、4号、331～332頁、1968年）。そしてこの菌を用いて発酵乳を製造し、pH 4.6～4.9で7日間保持した場合、この菌の生残率は約 $\frac{1}{100}$ に減少することも知られている（F. Müllerら：Milchwissenschaft、23巻、9号、554～558頁及び10号、614～618頁、1968年）。そし

特開昭58-224685(8)で Millerらはこの論文の中でビフィドバクテリウム菌を含む発酵乳製品において、製品のpHが4.3以下であってはならないと述べている。このことはこの菌がpH 4.3以下において急速に死滅することを意味している。従って、公知のビフィドバクテリウム属に属する菌を食品、医薬品、飼料に使用する場合、酸性の食品の保存中に、又、食品、経口投与医薬品又は飼料として用いたときには、人あるいは動物の胃の低いpHにおいて死滅する欠点がある。

このような点からビフィドバクテリウム属に属する耐酸性菌について研究がなされ、B. ビフィダムについて耐酸性を有する変異株の存在するこ^(多公報)とが知られ（特公昭56-42250）、そしてこれらの変異株を用いた発酵乳の製造法も知られ

ている（特開昭52-83975）。又、先に川島らが発明した特許第708393号（特公昭47-29995号公報）におけるラクトバチルス・ビフィダス変異株M-7204 (*Lactobacillus bifidus* var. M-7204)（微研研育苗第1324号。以下寄託株という。）は、耐酸性を有する菌株であり、そしてこの菌株は現在の分類によればB. ロンガムに属する変異株である。しかし後述するように寄託株と本菌とは生物学的性質が異なり、特に耐酸性において本菌が格段にすぐれている。

以上のように多種、多株にわたって人の消化管に存在するビフィドバクテリウム属の細菌のうち、年令を問わず人の腸管内に広く存在することが知られ（American Journal of Clinical

Nutrition, 30巻、1799～1810頁、1977年）、その出現頻度が最も高い（Cancer Research, 55巻、3407～3417頁、1975年）B. longum^{ロングム}について耐酸性を有する菌株を取得することは食品、飼料あるいは医薬品産業上特に利用価値の高いもの未であるが、未だ満足すべき菌株は知られていない。

本発明者は、ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する菌であって、強い耐酸性を有する菌を分離すべく検索を行ない、健康な乳児粪便からビフィドバクテリウム・ロンガムに属し、耐酸性を有する有用性ある菌株を見出した。

次に本発明について詳細に記載する。

(1) 耐酸性菌株の取得

本発明者は前記のような耐酸性を有する菌株

特開昭58-224685(9)

を自然界から取得すべく、ビフィドバクテリウム属に属する菌種が多数存在する健康な乳児の糞便から次の方法により菌株の分離を行なった。

乳児糞便を滅菌生理食塩水で適宜希釀し、MG寒天培地 (*Modified Garche's Agar* の略、寺口ら、食品衛生学雑誌、23巻、1号、39～44頁、1982年) の平板に塗抹し、37°Cで嫌気培養した。そして得られたコロニーの中でビフィドバクテリウム属特有の形態を示し、かつ塗抹標本の顕微鏡観察によりグラム陽性であり、桿状、こん棒状又は分岐状の菌形を示す菌を釣廻しMG寒天平板培地に画線塗抹し、前記と同様の方法で嫌気培養を反復し、純粋に単離された菌株を得た。この菌株をpH 4.5～5.5に調整したMG寒天平板培地で嫌気培養し、得られたコロニーを

更にベニシリンGカリウム(明治製薬製) 0.5～1.0単位/ mL 含有 MG寒天平板培地で嫌気培養し20余の菌株を得た。次いでこれらの菌株を上記2種の MG 寒天平板培地で嫌気培養を反復し、最も生育のすぐれた1菌株を分離した。

(2) 菌学的性質

この分離した菌株の菌学的性質は、次のとおりである。

2-1) 生理学的性質

- a) ガスを産生せず
- b) 15°Cで発育せず
- c) 運動性なし
- d) 好気的条件で発育せず
- e) ブドウ糖からの主な発酵生成物
乳酸及び酢酸

f) 糖からの酸生成

アラビノース、キシロース、グルコース、フランクトース、ガラクトース、シュークロース、マルトース、ラクトース、メリビオース、メレチトースは陽性、
ラムノース、リボース、セロビオース、トレハロース、グリコーゲン、イヌリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、エスクリン、サリシン、アミグダリン、グルコン酸塩は陰性、

- g) インドール産生せず
- h) 硫化水素産生せず

i) 硝酸塩を還元せず

j) カタラーゼ陰性

k) ベニシリン含有 MG 寒天平板培地 (ベニシリンGカリウム 0.5～1.0単位/ mL) で発育 (後述する(3)の試験参照)。

l) 耐酸性 (後述する(4)の試験参照)
菌体を滅菌した緩衝液に懸濁して pH を 4.3 に調整し、5°Cで7日間保持した時、少なくとも 1% の生残率を示す。

2-2) 形態学的性質

- a) 菌形 (光学顕微鏡による観察)
B.I. 寒天平板培地 (光岡知足: 臨床検査、18巻、1163～1172頁、1974年) を用い、3.7°Cで48時間常法により嫌気培養した本菌は、0.5～0.8 × 1.7～4.0 μ 、

桿状、こん棒状又は分岐状の菌形を有する。

b) コロニーの形態

前記2-2) のa) と同一の条件で培養した本菌のコロニーの形態（光岡知足著「腸内菌の世界」、110頁、叢文社、1980年8月）は次のとおりである。

形 状：円形 (*circular*)

隆 起：凸円状 (*convex*)

周 縁：円滑 (*entire*)

大きさ（直径）：1～3mm

色 調：褐色で不透明

表 面：円滑で光沢あり

以上の菌学的性質から、本菌は糖の発酵性のうちATCCのカタログ記載の菌株（以下ATCC株と記載する）とはリボース及びラフィノースに

特開昭58-224685 (10)
ついて異っているが、分類学上公知のB. ロンガムに属する菌学的性質を示し、かつ耐酸性において公知のATCC株と異っている。さらにこの性質は20代にわたって継代培養しても維持されていたので、本菌独特の性質とみることができ、本菌は公知の菌株にはないすぐれた耐酸性を有する新菌株と認められる。

本発明者らはこの菌株をB. ロンガム M-8201と命名し、昭和57年5月31日に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託し、微工研菌寄第6548号なる受託番号を得た。

(3) ベニシリンGカリウムに対する感受性の比較

本菌、前記寄託株、ATCC15707及びATCC15708の4種のB. ロンガムに属する菌株について、ベニシリンGカリウムに対する感

受性を次の方法により試験した。上記4菌株をブリッジスリバーブロース（光岡知足；臨床検査、18巻、1163～1172頁、1974年）に5% (V/V) 接種し、37°Cで24時間培養した培養液を被検菌液とした。次にMG寒天培地を用いて調製したベニシリンGカリウムを含む平板に前記被検菌液の1白金耳を画線塗抹し、37°Cで常法により嫌気培養した。2～5日培養後、コロニーの形成の有無を観察し、各菌株のベニシリンGカリウムに対する感受性の比較を行なった。ベニシリンGカリウムの培地中の濃度とコロニー形成の有無を第2表に示す。

第2表

ベニシリンGカリウムの濃度	本菌	寄託株	ATCC15707	ATCC15708
0 (単位/ml)	+	+	+	+
0.05	+	+	+	+
0.1	+	+	+	-
0.5	+	-	-	-
1.0	(+)	-	-	-

(注) + : コロニーを形成する

(+) : わずかにコロニーを形成する

- : コロニーを全く形成しない

第2表から明らかのように本菌は、他の3菌株よりベニシリンGカリウムに対する感受性が低く0.5～1.0単位/mlの濃度でも発育可能であった。

Sutler及びPingold (Antimicrobial

Agents and Chemotherapy、10巻、4号、

736～752頁、1976年) はビフィドバク

テリウム属のベニシリンGに対する感受性は、

0.5 単位/ ml 以下と報告しており、本菌はビフィドバクテリウム属の中でもベニシリン G カリウムに対して低い感受性を示す菌株である。

(4) 耐酸性の比較

本菌、前記寄託株、ATCC 15707、ATCC 15708 の 4 種の B. ロンガムに属する菌株について、耐酸性を次の方法により試験した。

4-1) ミルクカルチャーオンにおける生残性試験

前記ブリッジスリバーブロースを用いて調整した前記 4 菌株の前培養液を酵母エキス 0.25% (W/W) を添加した 10% (W/W) 還元脱脂乳培地に 10% (V/V) 接種して 37°C で 6~8 時間培養し、さらに同培地で 2~4 代継代培養し、pH 4.8 のミルクカルチャーを調製した。

特開昭 58-224685 (11)

このミルクカルチャーを急冷して 5°C で保存した場合の生菌数の変化と生残率を第 3 表に示す。

ビフィドバクテリウム菌の生菌数は、ミルクカルチャーを光岡（臨床検査、18巻、1163~1172 頁、1974 年）の希釈液で段階的に希釈した後、MG 寒天培地の試験管を用いた高層寒天培養法（寺口ら：食品衛生学雑誌、23 卷、1 号、39~44 頁、1982 年）で測定した。

第 3 表

使用した B 菌株	項目	保 存 日 数				
		0	3	5	7	
本 菌	生菌数	1.4×10 ⁹	1.4×10 ⁹	1.1×10 ⁹	7.5×10 ⁸	
	生残率(%)	100	100	78.6	53.6	
寄託株	生菌数	3.0×10 ⁹	1.8×10 ⁹	3.3×10 ⁸	4.5×10 ⁷	
	生残率(%)	100	60.0	1.1.0	1.5	
ATCC 15707	生菌数	2.8×10 ⁹	9.5×10 ⁷	6.0×10 ⁶	5.9×10 ⁵	
	生残率(%)	100	3.4	0.2	0.02	
ATCC 15708	生菌数	2.1×10 ⁹	3.5×10 ⁸	4.9×10 ⁷	3.0×10 ⁶	
	生残率(%)	100	16.7	2.3	0.1	

(注) 酸数は 1 g 当り

第 3 表から明らかなように本菌は他の 3 菌株よりミルクカルチャーにおける生残性が極めて高く 7 日間の保存で 50% 以上の生残率を示した。

4-2) 低 pH 缓衝液における生残性試験

前記 4 菌株のミルクカルチャーを滅菌生理食塩水で 1/10 に希釈し、これを各 pH の緩衝液に 1/30 の割合で添加、混合し、最終的に 4.0、4.3、4.6、5.0、6.0 の 5 段階の pH になるように調整して 5°C に保存した。緩衝液は pH 4.0~5.0 の場合 1/100 モルの酢酸一水酸化ナトリウムの酢酸緩衝液を使用し、pH 6.0 の場合、1/100 モルのリン酸 2 ナトリウム-リン酸 1 カリウムのリン酸緩衝液を使用した。

前記 pH 缓衝液中の前記 4 菌株の生菌数の変化と生残率を第 4 表に示す。生菌数は前記 4-1) 項

記載の方法で測定した。

結果を第4表に示す。

第4表

pH	使用したB菌株	保 存 日 数					
		0	3	5	7	生菌数	生菌率
6.0	本菌	3.0×10^6	100	2.8×10^4	93.3	1.7×10^4	56.7
	寄託株	5.6×10^6	100	3.1×10^4	55.4	1.5×10^4	56.7
	ATCC15707	3.6×10^6	100	1.9×10^4	52.8	8.1×10^3	62.1
	ATCC15708	4.0×10^6	100	2.2×10^4	55.0	8.8×10^3	5.0
5.0	本菌	3.5×10^6	100	2.3×10^4	65.7	1.5×10^4	42.9
	寄託株	5.2×10^6	100	1.3×10^4	25.0	2.5×10^4	4.8
	ATCC15707	3.5×10^6	100	1.8×10^4	5.1	2.2×10^4	0.6
	ATCC15708	2.8×10^6	100	1.5×10^4	5.4	2.4×10^4	0.9
4.6	本菌	2.8×10^6	100	1.0×10^4	35.7	5.6×10^3	20
	寄託株	5.2×10^6	100	1.5×10^4	2.9	1.4×10^4	0.3
	ATCC15707	3.8×10^6	100	6.7×10^3	1.8	2.2×10^4	0.06
	ATCC15708	2.5×10^6	100	4.6×10^4	1.8	3.8×10^3	0.2
4.3	本菌	2.5×10^6	100	6.8×10^4	27.2	1.6×10^4	6.4
	寄託株	4.8×10^6	100	1.3×10^4	0.3	3.2×10^4	0.007
	ATCC15707	4.5×10^6	100	5.7×10^3	0.1	9.0×10^4	0.002
	ATCC15708	3.5×10^6	100	4.0×10^4	0.2	1.2×10^4	0.003
4.0	本菌	2.5×10^6	100	3.1×10^4	12.4	5.0×10^4	2.0
	寄託株	5.5×10^6	100	4.5×10^3	0.08	1.2×10^4	0.002
	ATCC15707	4.8×10^6	100	2.0×10^4	0.004	$<10^4$	0
3.0	ATCC15708	3.0×10^6	100	3.2×10^4	0.01	2.8×10^4	0.0009
	ATCC15708	3.0×10^6	100	3.2×10^4	0.01	2.8×10^4	0

(注) 1) 重量は1g当たり

2) 生菌率: %

第4表から明らかなように、本菌はいずれのpHにおいても他の3菌株より生残性が高く、特にpH 4.0～5.0の低いpH領域においてその差が顕著である。

即ち本菌を5°Cで7日間保存した場合、pH 5.0において24.3%、pH 4.6において11.8%、pH 4.3において1.2%、pH 4.0において0.3%の生残率を示すのに対して、他の3菌株はpH 5.0においてさえも生残率がいずれも1%未満である。

本菌の試験結果は、前記 Müllerらの報告と比較しても格段にすぐれでいる。即ち Müllerらの報告ではpH 4.6～4.9で7日間保存したときのビフィドバクテリウム菌の生残率が約1%であるのに対して、本菌のそれはpH 5.0

で24.3、pH 4.6で11.8%である。

このように本菌は低いpH領域においてすぐれた耐酸性を有し、この性質は従来公知の菌株及び文献にも認められないすぐれたものである。

前記の結果と同様の傾向は、前記液体培地プリングスリバーブロースで培養した各菌株の菌体についても認められた。

4-3) ヨーグルトにおける生残性試験

1.2% (W/W) の還元脱脂乳を90°Cで10分間殺菌した後、45°Cに冷却し、1.0% (W/W) 還元脱脂乳で調整したストレプトコッカス・サモフィルス (*Streptococcus Thermophilus*) とラクトバチルス・ブルガリクスの混合カルチャ-3% (V/V) および本菌のミルクカルチャ-2% (V/V) を接種し、40°Cで5時

間発酵し、のち直ちに冷却し、ヨーグルトを製造した。そしてこのヨーグルトを5°Cで10日間保持し、ヨーグルト中の本菌の生菌数を測定した。生菌数の測定は、ヨーグルトを前記光岡の希釈液で段階的に希釈し、ビフィドバクテリウム菌選択培地であるM.G.I.P寒天培地(寺口ら:食品衛生学雑誌、23巻、1号、39～44頁、1982年)を使用した高層寒天培養法によった。

又比較のため本菌の代りにATCC15708を用いて同様に試験した。そして生菌数の変化及び生残率を、ヨーグルトのpH及び乳酸酸度の参考値とともに第5表に示す。

尚、前記寄託株及びATCC15707を用いた試験も行なったが、ATCC15708とはほぼ同等の結果を示したので、これらの菌株の結果は

第5表に記載しなかった。

使用した B菌株	項目、	保 存 日 数				
		直 後	3	7	10	
本菌	pH	4.60	4.60	4.54	4.52	
	乳酸濃度(%)	0.88	0.93	0.96	0.98	
	B菌数	2.5×10 ⁷	2.0×10 ⁷	1.7×10 ⁷	8.0×10 ⁶	
ATCC15708	B菌生存率(%)	100	80	68	32	
	pH	4.62	4.60	4.56	4.55	
	乳酸濃度(%)	0.87	0.89	0.95	0.96	
	B菌数	3.4×10 ⁷	2.0×10 ⁶	3.0×10 ⁵	3.9×10 ⁴	
	B菌生存率(%)	100	5.9	0.88	0.11	

(注) 1) B菌: ピファイドバクテリウム菌
2) 菌数は10⁹当り

生残率もすぐれていることが試験により確認されているので本菌の用途は極めて広範である。たとえば、古くから知られている人又は動物の医薬品としての整腸剤に利用できることは勿論、粉末状の食品、飼料あるいは液状又は半固状の飼料、食品に添加あるいは混在させることもできる。このように本菌は従来公知の菌株には認められないすぐれた性質を有しており、商業上極めて有用である。

実施例 1

肉エキス50g、酵母エキス100g、ベブトン100g、乳糖200g、K₂HPO₄ 50g、KH₂PO₄ 10g、シスチン4g及び水9.5lからなる培地(pH 6.5) 10lを121°Cで15分間滅菌し、37°Cに冷却した。一方、予め

第5表から明らかなように本菌を使用して製造したヨーグルトを5°Cで10日間保存した場合、ヨーグルト中には製造直後の32%の本菌が生存している。一方 ATCC15708 を使用して製造したヨーグルトでは、1%以下の生残率であり本菌の生残率が極めて高い。

このように酸性の食品、低pH緩衝液及び、ミルクカルチャーやにおいて、本菌の生残率と他のB.ロングムに属する菌のそれとの間には格段の相違が認められ、本菌はすぐれた耐酸性を有することが判明した。

以上のことから本菌は本質的に耐酸性を備えており、培養物又はその加工物の保存中の生菌数の低下が少なく、広いpH域の飲食物への加工が可能である。更に本菌を凍結及び凍結乾燥したときの

同一組成の培地により37°Cで16時間前培養した本菌のシードカルチャー500mlを前記の培地10lに接種し、37°Cで16時間培養した。さらに90°Cで30分殺菌した同一組成培地200lに前記培養液全量(10.5l)を接種し、37°Cで16時間培養した。培養後の生菌数は2.5×10⁹/mlであった。

次いでシャーブレス型遠心分離機(15,000 rpm)により菌体を集め、培地と同量の90°Cで30分間殺菌の生理食塩水に再懸濁し、前記と同様遠心分離して再度集菌した。得られた菌体を脱脂粉乳10% (W/W)、蔗糖1% (W/W)、グルタミン酸ソーダ1% (W/W)からなる溶液(90°C、30分殺菌)20lに懸濁し、常法に従って凍結乾燥し、1.4×10¹¹/gの本菌を含

有する粉末約2.2kgを得た。

実施例2

酵母エキス0.2% (W/W)、脱脂粉乳10% (W/W) からなる90°C 30分殺菌後の培地1000mLに本菌を接種し、37°Cで6時間培養した。一方、10% (W/W) 選元脱脂乳培地1500mLを90°Cで30分間殺菌し、ストレプトコッカス・サーモファイルス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*) の混合カルチャーワーク50mLを接種し、42°Cで4時間培養した。

これとは別に乳脂肪3.1% (W/W)、無脂乳固形分9% (W/W) からなる生乳50Lを60°Cに加温し、150kg/cm²の圧力で均質し、90°C

例1で得た本菌を含有する粉末20gを加えて均一に混合し、10% /g の本菌を含有する粉末の整腸剤約20kgを得た。

実施例4

トマトピューレ800g、蔗糖20g、食塩1g、グルタミン酸ソーダ0.8g、香料0.5g（いずれも市販品）を水160gと混合し、殺菌冷却し、更にこの混合液に実施例2と同様の方法で調整した本菌20gと常法により調整したラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) のカルチャーワーク50gとを添加して均一に混合し、ビフィズス生菌入り乳酸菌飲料約1kgを製造し、100mL容ガラスピン10本に分注して密封した。この乳酸菌飲料は製造直後のpHが4.60であり本菌を4.8×10⁶/mL、ラクトバチルス・カゼイ

で10分間殺菌し、40°Cに冷却した。この殺菌した牛乳に前培養した前記の本菌カルチャーワーク1000mL及びストレプトコッカス・サーモファイルスとラクトバチルス・ブルガリクスの混合カルチャーワーク1500mLを接種し、500mL容の容器に充てんし、密封し、40°Cで4時間培養し、直ちに冷却した。得られた発酵乳は乳酸濃度0.85%、pH 4.40であり、本菌8.2×10⁶/mL、ストレプトコッカス・サーモファイルス3.7×10⁷/mL、ラクトバチルス・ブルガリクス3.1×10⁷/mLを含有していた。この発酵乳を10°Cで10日間保存したときの本菌の菌数は2.1×10⁶/mLであり生残率は26%であった。

実施例3

乾燥殺菌した澱粉14kg及び乳糖6kgに、実施

を5.2×10⁶/mL含有し、10°Cで10日間保存したのちの本菌の菌数は5.9×10⁶/mL、生残率12%であった。

実施例5

市販のコーンミール3.9kg、大豆粕2.1kg、ホーク粉1.0kg、脱脂粉乳1.0kg、ルーサンミール5kg、蔗糖8kg、乳糖2kg、第2リン酸カルシウム1kg、炭酸カルシウム0.5kg、飼料用混合無機塩（オリエンタル酵母工業製）0.5kg、飼料用混合ビタミン（オリエンタル酵母工業製）1kgからなる子豚用配合飼料100kgに実施例1で得た本菌を含有する粉末10gを添加して均一に混合し、子豚育生用の粉末飼料約100kgを得た。この飼料には1g当り、製造直後1.4×10⁷の本菌が含まれ、室温で3ヶ月間保存後では1g当

り 3.0×10^5 の本菌が含まれていた。

手 球 植 正 替 (方 式)

昭和57年10月19日

特許庁長官 若 杉 和 夫 様

1 事件の表示

昭和57年特許第106182号

2 発明の名称

ビフィドバクテリウム・ロンガムに関する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含む組成物

3 補正をする者

事件との關係 特許出願人

東京都渋谷区芝五丁目33番1号

(612) 森永乳業株式会社

代表者 門前 賢

4 代理人

東京都渋谷区成ノ門1-11-5森谷ビル

(8715)弁理士 鈴井 勉
〒105 電話 03-595-1530 *印合*

5 補正命令の日付 昭和57年9月9日

(昭和57年9月28日請求)

6 補正の対象 明細書

7 補正の内容

明細書第1ページ、第20ページないし第23ページ、第38ページ、第41ページ、第44ページおよび第49ページを別紙のとおりに補正します。
(ただし第1ページ以外は内容に変更なし。)

明 細 書

1. 発明の名称

ビフィドバクテリウム・ロンガムに関する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含む組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5°Cで7日間保持した時、少くとも1%の生存率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガム。

(2) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムが下記の菌学的性質を示すことを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の菌体。

(a) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5°Cで7日間保持した時、少

表 1

音名	B. ロンガム ロガム、コングラム	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム s.s. ロンガム	B. ロンガム s.s. ロンガム	B. ロンガム ロイター
ハイオタイプ	—	—	—	—	—
ダリコーナン	—	—	—	—	—
イスリン	—	—	—	—	—
マンニトール	—	—	—	—	—
ソルビトール	—	—	—	—	—
イノシトール	—	—	—	—	—
リビトール	—	—	—	—	—
ズルシトール	—	—	—	—	—
グリセロール	—	—	—	—	—
エリスリトール	—	—	—	—	—
ラムノース	—	—	—	—	—
エスクリン	—	—	—	—	—

（後12 緯1、1）

文 章	(1)	(2)	(3)
癡および バイオタイプ	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム
4.65°Cに おける生育	—	—	
リトマス ミルク凝固	+	+	
アラビノース	+	+	+
キシロース	+	+	+
リボース	+	+	+
マンノース	+s/-	+s/-	+
フラクトース	+	+	+
グルコース		+	+

（後編）

歯音より バイオタイプ	R. ロンガム <i>var.</i> ロンガム	R. ロンガム var. ロンガム	R. ロンガム s.s. ロンガム	R. ロンガム s.s. ロンガム	B. ロンガム ロイター
サリシン	—	—	—	—	—
アミグダリン	—	—	—	—	—
α-メチル グルコシド	+S	+S	+S	+S	—
α-メチル マンノシド			—	—	—
グルコニート					—
清 手			グルコースからガス 產生せず。 ソルホース: 潜性	同 左	注 1)

-401-

特開昭58-224685(17)

卷之三

第2表

ベニシリングカリウムの濃度 0 (単位/ μ)	本菌	寄託株	ATCC15707	ATCC15708
0.05	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+
0.5	-	-	-	-
1.0	-	-	-	-

(注) + : コロニーを形成する

++ : わずかにコロニーを形成する

- : コロニーを全く形成しない

第2表から明らかのように本菌は、他の3菌株

よりベニシリングカリウムに対する感受性が低く

0.5~1.0 単位/ μ の濃度でも発育可能であった。

Sutter 及び Finegold (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 10巻, 4号,

736~752頁、1976年) はビフィドバク

テリウム属のベニシリングに対する感受性は、

第3表

使用したB菌株	保育日数			項目	保育日数		
	0	3	5		0	3	5
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.0 ATCC15707	3.0×10 ⁴	100	2.8×10 ⁴	93.3	1.7×10 ⁴	5.67	5.67
ATCC15708	5.6×10 ⁴	100	5.1×10 ⁴	55.4	1.5×10 ⁴	26.8	6.2×10 ³
ATCC15707	3.6×10 ⁴	100	1.9×10 ⁴	52.8	8.1×10 ³	22.5	1.8×10 ³
ATCC15708	4.0×10 ⁴	100	2.2×10 ⁴	55.0	8.8×10 ³	22.0	3.8×10 ³
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
5.0 ATCC15707	5.5×10 ⁴	100	2.5×10 ⁴	65.7	1.5×10 ⁴	42.9	8.5×10 ³
寄託株	5.2×10 ⁴	100	1.5×10 ⁴	25.0	2.5×10 ⁴	4.8	3.2×10 ⁴
ATCC15707	3.5×10 ⁴	100	1.8×10 ⁴	5.1	2.2×10 ⁴	0.6	1.0×10 ⁴
ATCC15708	2.8×10 ⁴	100	1.5×10 ⁴	5.4	2.4×10 ⁴	0.9	1.9×10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.6 ATCC15707	2.8×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	55.7	5.6×10 ⁴	2.0	3.5×10 ⁴
寄託株	5.2×10 ⁴	100	1.5×10 ⁴	2.9	1.4×10 ⁴	0.3	1.0×10 ⁴
ATCC15708	3.8×10 ⁴	100	6.7×10 ³	1.8	2.2×10 ⁴	0.06	3.6×10 ⁴
ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	4.6×10 ³	1.8	3.8×10 ⁴	0.2	8.3×10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	6.8×10 ³	27.2	1.6×10 ⁴	6.4	2.9×10 ⁴
寄託株	4.8×10 ⁴	100	1.3×10 ⁴	0.3	3.2×10 ⁴	0.0007	1.8×10 ⁴
ATCC15707	4.5×10 ⁴	100	5.0×10 ³	0.1	9.0×10 ³	0.0002	<10 ³
ATCC15708	3.5×10 ⁴	100	6.0×10 ³	0.2	1.2×10 ⁴	0.0003	1.3×10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15707	4.8×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.0 ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	0.08	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	0.08	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴

(注) 適度は10当り

(注) 1) 適度は10当り

2) 生残率: %

第4表

pH	保育日数			項目	保育日数		
	0	3	5		0	3	5
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.0 ATCC15707	3.0×10 ⁴	100	2.8×10 ⁴	93.3	1.7×10 ⁴	5.67	5.67
ATCC15708	5.6×10 ⁴	100	5.1×10 ⁴	55.4	1.5×10 ⁴	26.8	6.2×10 ³
ATCC15707	3.6×10 ⁴	100	1.9×10 ⁴	52.8	8.1×10 ³	22.5	1.8×10 ³
ATCC15708	4.0×10 ⁴	100	2.2×10 ⁴	55.0	8.8×10 ³	22.0	3.8×10 ³
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
5.0 ATCC15707	5.5×10 ⁴	100	2.5×10 ⁴	65.7	1.5×10 ⁴	42.9	8.5×10 ³
寄託株	5.2×10 ⁴	100	1.5×10 ⁴	25.0	2.5×10 ⁴	4.8	3.2×10 ⁴
ATCC15707	3.5×10 ⁴	100	1.8×10 ⁴	5.1	2.2×10 ⁴	0.6	1.0×10 ⁴
ATCC15708	2.8×10 ⁴	100	1.5×10 ⁴	5.4	2.4×10 ⁴	0.9	1.9×10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.6 ATCC15707	2.8×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	55.7	5.6×10 ⁴	2.0	3.5×10 ⁴
寄託株	5.2×10 ⁴	100	1.5×10 ⁴	2.9	1.4×10 ⁴	0.3	1.0×10 ⁴
ATCC15708	3.8×10 ⁴	100	6.7×10 ³	1.8	2.2×10 ⁴	0.06	3.6×10 ⁴
ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	4.6×10 ³	1.8	3.8×10 ⁴	0.2	8.3×10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	6.8×10 ³	27.2	1.6×10 ⁴	6.4	2.9×10 ⁴
寄託株	4.8×10 ⁴	100	1.3×10 ⁴	0.3	3.2×10 ⁴	0.0007	1.8×10 ⁴
ATCC15707	4.5×10 ⁴	100	5.0×10 ³	0.1	9.0×10 ³	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.5×10 ⁴	100	6.0×10 ³	0.2	1.2×10 ⁴	0.0003	1.3×10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.5×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.3 ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	0.08	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
寄託株	4.8×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.5×10 ⁴	100	6.0×10 ³	0.2	1.2×10 ⁴	0.0003	1.3×10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.5×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.0 ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	0.08	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
寄託株	4.8×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.1 ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	0.08	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
寄託株	4.8×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.2 ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	0.08	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
寄託株	4.8×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴	100	3.1×10 ³	12.4	5.0×10 ⁴	2.0	7.7×10 ⁴
寄託株	5.5×10 ⁴	100	4.5×10 ³	0.8	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌率
4.3 ATCC15707	2.5×10 ⁴	100	1.0×10 ⁴	0.08	1.2×10 ⁴	0.0002	<10 ⁴
寄託株	4.8×10 ⁴	100	2.0×10 ⁴	0.004	<10 ⁴	0	<10 ⁴
ATCC15708	3.0×10 ⁴	100	3.2×10 ³	0.01	2.8×10 ⁴	0.0009	<10 ⁴
本菌	2.5×10 ⁴ </						

第 5 表

使用した B菌株	項目	保 存 日 数			
		直 後	3	7	10
本 菌	pH	4.60	4.60	4.54	4.52
	乳酸濃度(%)	0.88	0.93	0.96	0.98
	B菌菌数	2.5×10^7	2.0×10^7	1.7×10^7	8.0×10^6
	B菌生残率(%)	100	80	68	32
ATCC15708	pH	4.62	4.60	4.56	4.55
	乳酸濃度(%)	0.87	0.89	0.95	0.96
	B菌菌数	3.4×10^7	2.0×10^6	3.0×10^6	3.9×10^4
	B菌生残率(%)	100	5.9	0.88	0.11

(注) 1) B菌: ピファイドバクテリウム菌

2) 菌数は1g当り